

### 3. ウイルス第三部

#### 部長 田代真人

#### 概要

当部は村山分室に配置され、第1室（インフルエンザウイルス）、第2室（風疹ウイルス）、第3室（麻疹ウイルス）、第4室（ムンプスウイルス）、第5室（ウイルス性呼吸器感染症とサイトカイン）で構成される。研究業務は、各ワクチン製剤とサイトカイン製剤の品質管理、および当該疾患の病原・病因・予防・診断・治療に関する研究、レファランス業務および国際協力である。

人事異動では、4月1日に田口文広主任研究官が第5室長に昇任し、野田雅博が主任研究官に採用された。12月1日に沼崎啓が第3室長に、2月28日に氏家誠が第5室研究員に各々採用された。一方、3月31日付けで斉藤早久良主任研究官と関谷成則技官が定年退職し、齋藤義弘主任研究官が退職した。

業務では、インフルエンザ、風しん、麻しん、おたふくかぜの各ワクチンおよびγグロブリン製剤に関する国家検定、検査、特別審査、研究業務を担当した。インターフェロン製剤の収去検査と各感染症の体外診断薬依頼検査も行った。また、各種標準品・参照品を製造して配布した。GMPやWHO新基準に準拠した品質管理体制の構築と内部諸規定の整備など、国際的に通用する近代的な品質管理体制への転換を図った。第3室はユニセフ買い上げ用麻疹ワクチンの品質管理に関してWHOの定期査察を受け、高い評価を得た。

研究業務では、インフルエンザ流行動向調査事業、感染症流行予測事業、ウイルス株系統保存事業を進め、全国地衛研と協力して流行ウイルスの解析と流行予測を行い、国内のワクチン株を選定した。新型インフルエンザ対策として、ワクチン緊急開発体制、抗ウイルス剤備蓄、健康危機管理のあり方等を検討して提言した。またWHO麻疹拡大予防接種計画に応じて、麻疹の免疫抑制機構、ワクチンの安全性と有効性、成人麻疹の実態と原因、2次性ワクチン効果不全の鑑別と実態解明、国及びWHOワクチン政策見直し提言、IgM抗体簡易診断法の

実用化、麻疹ウイルス分離用細胞の開発、麻疹ウイルスの分子疫学等の研究を進めた。風疹ウイルスでは、分子疫学および血清診断法の標準化、風疹ウイルス病原性機序、ワクチン政策の再検討の研究を行った。ムンプスウイルスでは、分子疫学、分子病態・病原性機構の研究、ワクチン全般については細胞や牛血清由来に由来するウイルスの検出方法の改良、動物由来の材料等を使用しない新ワクチンの開発を行った。またインターフェロン感受性・抵抗性の解析、二重鎖RNA依存性蛋白リ酸化酵素の研究を進めた。またリバーシ・ジェネティクスを駆使したセンダイウイルスの研究によりウイルス病原性の分子機構の解析を進めた。

国際協力では、WHOインフルエンザ協力センターとして各国から送付された多数のウイルス株を解析し、WHOインフルエンザワクチン推奨株を決定した。WHO世界インフルエンザ計画に参画し、地球レベルでの監視体制、大流行対応計画の策定および、WHO総会での採択を図った。また、中国や東南アジアでのインフルエンザ計画を支援し、多数の技術講習会や研修員の教育を行った。東南アジア諸国でのH5N1型高病原性鳥インフルエンザの流行に際しては、国内外のヒト検体の感染診断、分子疫学の解明、迅速簡易診断キットの開発、新型インフルエンザワクチン緊急開発を行った。また、WHOやJICAの要請に応じてアジア諸国に対して職員を派遣し、緊急技術支援、対策への助言・提言を行った。麻疹、風疹に関しては、WHO西太平洋地域レファランス検査室、WHO世界特別検査室に指定され、WHO麻疹・風疹拡大予防接種計画の策定・実施に協力し、標準検査法の開発・普及を行った。

#### 業績

#### 調査・研究

##### インフルエンザウイルスに関する研究

1. 高病原性鳥インフルエンザウイルスの流行におけ

## る実験室診断と国際協力

2003 年末から東アジアを中心に高病原性鳥インフルエンザ A/H5N1 が家禽の間で大流行し、1 億羽以上の家禽が斃死または殺処分されている。ベトナム、タイ、カンボジアではヒトへも感染し 50 名近い死者を出すまでに至り、これに起因した新型インフルエンザウイルスの出現とそれによる世界的な汎流行が危惧されている。当室では、WHO インフルエンザ協力センターとして、ベトナム、カンボジアなどから H5 ウイルス感染が疑われる患者の検体を受け入れ、培養細胞によるウイルス分離、RT-PCR 法および RT-LAMP 法によるウイルス遺伝子検出などの病原学的診断を行った。これら診断結果は検体送付国と WHO に逐一報告され、当該国での新型インフルエンザ対策に役立てられた。一方、臨床検体から分離された高病原性鳥インフルエンザウイルスについては、詳細な抗原解析と遺伝子解析が行われた。また、WHO-H5 ネットワークから随時海外分離株を入手し、同様に解析を行った。これら解析情報は随時 WHO-H5 ネットワーク間で交換され、ネットワーク参加国のワクチン開発のための資料として活用された。[今井正樹、二宮愛、小淵正次、板村繁之、西藤岳彦、斉藤利憲、小田切孝人、田代真人]

## 2. 本邦における家禽での高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) 発生に伴う防疫作業従事者の血清疫学調査

平成 16 年 2 月末に国内で今年 3 例目となる高病原性鳥インフルエンザ (H5N1) が京都府で発生し 25 万羽の鶏が処分された。その殺処分等の防疫作業に従事した作業者の感染リスクを評価するために作業従事者や作業非従事者の血清について中和抗体価を測定して調査した。その結果、対照検体の作業非従事者 33 名の血清はすべて検出限界未満 (中和抗体価 10 未満) となったため、中和抗体価 10 以上を陽性と判定した。作業従事者血清 58 検体中 5 検体が陽性と判定された。その内 4 名は養鶏場従事者で十分な防御対策がなされる前から感染鶏に接触しており、その間に感染した可能性が高いと推測された。しかしながら抗体陽性となった 5 名はいずれも発熱等の全身症状は無く、発症はしていなかったと考えられた。他の防疫従事者に比較して養鶏場従事者の陽性率が高かったことから、個人防護具の使用など感染防御対策

および抗インフルエンザ薬予防内服による発症阻止策が有効であったと考えられる。[板村繁之、砂川富正\*、上野正浩\*、増田和貴\*、谷口清洲\*、岡部信彦\*、藤田直久\*\*、京都府保健福祉部、小田切孝人、田代真人：\*感染症情報センター、\*\*京都府立医大]

## 3. インフルエンザワクチン株製造のための海外 GMP 施設の視察調査

新型インフルエンザワクチン株、特に H5、H7 亜型の高病原性ウイルスはリバースジェネティクス法を用いて弱毒化することによって作製することを想定している。しかしながら、現在国内にワクチン株を作製する GMP 対応の設備が無いため、当研究所村山庁舎に平成 19 年度完成を目指してワクチン株製造施設の建設が進められている。そこで、新型インフルエンザワクチン製造株の作製に係わる品質管理方法と必要設備の規格等についての情報を収集するために、新型インフルエンザのワクチン株を製造している海外研究施設である米国セントジュード小児研究病院と英国 NIBSC の 2 ヶ所と新型インフルエンザワクチンの試験製造を実施したオーストリアのバクスターワクチン社の製造所を視察調査した。ワクチン株製造については現状では厳格に GMP 管理下で実施するものと一定の品質管理方法を導入して実施している 2 つの形態が存在している。新型インフルエンザワクチン製造株を作製する GMP 対応の施設としては BSL3 の製造ルームが清浄度管理のなされた環境下であれば適切であると考えられる。GMP 対応には施設・建物などのハード面よりもソフト面での負担が大きく、どちらの方式を適正と考えるかは経費面とその品質確保に及ぼす影響を勘案して選択する必要がある。新型インフルエンザワクチン開発や製造に係わる品質管理方法、検定基準等については関係機関と協力して国際的にも整合性を維持しながら進めていく必要がある。[板村繁之、篠原克明\*、白山裕久\*\*：\*バイオセーフティ管理室、\*\*厚労省血液対策課]

## 4. 新型インフルエンザに対するアジュバント添加ワクチンの開発

現在認可されている製造方法に従って製造されたワクチンは新型インフルエンザ特に H5 亜型ウイルスに対し

て極めて低い免疫原性であることが臨床試験で明らかになってきた。そこでより免疫原性の高いワクチンの開発を短期間に行うために、現在アジュバントとして認可されているアラムを添加したワクチン開発を進めている。本年度は、アラム添加ワクチンのモックアップワクチンとして使用するワクチン株 NIBRG-14(H5N1)を英国 NIBSC より入手して製造株のマスターシードを GMP 製造施設で作製し、その抗原性や遺伝子の塩基配列について解析を実施した。得られたマスターシードは、作製されたワクチン株の性状を保持していることを確認し、それを製造株として試作ワクチンの製造を行った。また、試作ワクチンの力価試験に必要な一元放射拡散試験用の標準抗原、参照抗血清の作製も同時に行った。[板村繁之、金子睦子、今井正樹、小淵正次、細菌製剤協会、小田切孝人、田代真人]

#### 5. 新型インフルエンザワクチン株の開発

高病原性鳥インフルエンザウイルスの流行に備えるために、リバースジェネティクス(RG)法を用いてワクチン株を作製し、その安全性を検証した。A/PR/8/34 株の cDNA をバックボーンとする RG 系を用いて、2004 年にベトナムでヒトから分離された A/Vietnam/JP1203/2004 (H5N1) 株と京都でニワトリから分離された A/chicken/Kyoto/3/2004 (H5N1) 株を弱毒化した。これら弱毒化組み換えウイルスの病原性を調べるために、ニワトリ及びマウスへの接種試験を行った。その結果、組み換えウイルスはニワトリとマウスに対して病原性を示さず、十分に弱毒化されていることが確認できた。[二宮愛、今井正樹、喜田宏\*、小田切孝人、田代真人：\*北海道大学大学院]

#### 6. 新型インフルエンザワクチンの製造に用いる細胞株の検索

インフルエンザワクチン製造用の種ウイルスをリバースジェネティクス(RG)技術で作製するためには、ウイルス遺伝子をコードするプラスミド DNA を細胞にトランスフェクションすることが必要である。トランスフェクションに感受性を示す細胞株を検索することを目的として、American Type Culture Collection から様々なサル由来細胞株(CV-1 細胞、BS-C-1 細胞、LLC-MK2 細胞、

Vero 細胞)を購入し、これらが RG 技術に利用できるかどうかを検討した。その結果、プラスミド DNA の取り込み効率は LLC-MK2 細胞が最も高いことがわかった。さらに、この細胞を用いて、高病原性鳥インフルエンザウイルスの回収を行ったところ、非常に高いウイルス産生が得られることがわかった。[今井正樹、田代真人、小田切孝人]

#### 7. B 型インフルエンザウイルス BM2 蛋白の機能に関する研究

B 型インフルエンザウイルス第 7 分節 RNA によってコードされている BM2 は、イオンチャンネル活性をもつ膜蛋白質である。我々は、ウイルス増殖過程における BM2 の機能を明らかにするために、リバースジェネティクス法を用いて BM2 欠損および部分欠失変異株を作製し、それらの性状解析を行った。その結果、BM2 は B 型インフルエンザウイルスの増殖には必須な蛋白質であることが明らかになった。また、BM2 の欠損は M1 蛋白と細胞膜との親和性を低下させ、その結果、ウイルス粒子への M1-ヌクレオカプシド(vRNP)複合体の取り込みを著しく低下させることがわかった。このことから、BM2 はイオンチャンネル機能に加えて、ウイルス粒子への M1-vRNP 複合体の assembly にとって不可欠な機能を持つことが明らかになった。[今井正樹、二宮愛、小淵正次、小田切孝人]

#### 8. 新型インフルエンザウイルスに対するワクチンのマウスにおける有効性の検討

2003 年にヒトから分離された鳥由来の強毒株 A/Hong Kong/213/2003 (H5N1)をもとに作製したワクチン株 rgHK213 を用いて、ホルマリン不活化全粒子ワクチンを試作した。アルミニウムアジュバントと共にマウスに皮下接種して免疫した後、ワクチンの元株ならびに 2004 年に分離された強毒 H5N1 ウイルスで攻撃し、感染防御効果を調べた。その結果、微量の抗原でもアジュバントの使用により、同型同株と同型異株両方のウイルスに対する感染防御能を効果的に誘導できる可能性が示された。[二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人]

#### ・ 風疹ウイルスに関する研究

## 1. 風疹抗体測定のための国内標準品の作製と評価(続)

昨年度測定した風疹 IgG 抗体用国内標準品候補の抗体価を確認するために、他施設に EIA による平行線定量法と HI 試験法による抗体測定を依頼した。感染研による測定結果と同等な値が得られ、測定法の妥当性が確認された。エンザイグノストとプラテリアの IgG キットを用いても同等な抗体価が得られ、平行線定量法はデンカ以外のキットにも、また、感染後急性期、回復期の IgG 抗体測定にも応用可能であった。しかし、国際標準品の値がバイアルによって変動したため、国内標準品の値付けをし直す必要が生じた。[海野幸子、堀内善信\*、加藤宏幸、大槻紀之、門澤和恵 : \*細菌第二部]

## 2. RT-PCR による風疹ウイルス遺伝子検出の標準化

nested RT-PCR 法による風疹ウイルス遺伝子検出は高感度であるが、単一反応条件による結果は定量性に難点がある。感染の有無の判断は、当該手法の検出感度によって左右されるため、複数施設における検査には同等の感度が必要となる。このため標準ウイルス (M-33) の段階希釈液を調製し、複数検査施設に配付し、感度の比較を行った。結果の連絡を受けた 1 施設では、ほぼ同程度の感度 (3 倍程度の差異) が得られている。

[加藤宏幸、門澤和恵、海野幸子]

## 3. Vero 細胞を用いた風しんワクチンウイルスの無血清培養系の確立(続)

無血清培地 DM201 に馴化させた Vero 細胞で 5 代継代した風しんワクチンウイルスの E1 遺伝子は、元のワクチンウイルス及び従来の牛血清を含む培地で培養された Vero 細胞で継代されたウイルスと同じ配列であった。一方、ペプトン(大豆由来)を添加した無血清培養の同 Vero 細胞で 5 代継代したウイルスではアミノ酸の変化を伴う塩基の変異が 1 箇所認められた。この変異が培地組成の影響か、継代過程で一定の頻度で現れるものかは不明である。少なくとも 5 代の継代の範囲で、DM201 のみを用いた Vero 細胞無血清培養系の風しんワクチン製造への応用性が示された。[海野幸子、大槻紀之、加藤宏幸、門澤和恵、大良勇治]

## 4. ワクチンの品質管理に関する検討(続)

細胞培養用牛血清中には高率にウシポリオーマウイルス (BPyV) 遺伝子が混入している。遺伝子の存在が感染性を有するウイルスの存在を意味するかどうかは不明であるが、多くの生ウイルスワクチンはその製造に牛血清を使用しているため BPyV 遺伝子がワクチン中に混入する可能性がある。そこで、国内流通している生ウイルスワクチン(麻しん、風しん、おたふくかぜ、ポリオ、水痘)から BPyV 遺伝子の検出を試みた。その結果水痘ワクチンの一部のロットから BPyV 由来遺伝子が検出された。しかし、一定の長さ以上のウイルス遺伝子断片は検出されなかったことから、当該ワクチン中に感染性を有する BPyV が存在する可能性は低いと考えられた。[大槻紀之、伊藤治\*、海野幸子、田代 真人 : \*農林水産省動物医薬品検査所]

## 5. ニワトリ初代腎細胞のウイルス感受性

トリ培養細胞由来の生ウイルスワクチンの外来性ウイルス等否定試験に用いているニワトリ初代腎細胞のトリ由来ウイルスに対する感受性を調べた。8PFU のトリパラミクソウイルス (Yucaipa) を細胞に感染させて 2 週間培養すると  $10^{5.9}$  に、 $10^{1.9}$  PFU のトリコロナウイルス (IBV) は  $10^{4.7}$  PFU に増殖した。比較に用いたウズラ初代胚細胞では Yucaipa は接種量の 20 倍に、IBV は検出限界以下にしかそれぞれ増殖しなかった。ニワトリ初代腎細胞はこれらトリ由来ウイルスに対して高い感受性を有しており、外来性ウイルス等否定試験に用いることの有利性が示された。[海野幸子、加藤宏幸、大槻紀之、植村やよい\*、大良勇治 : \*生化学工業株式会社]

## 6. ワクチン製造株の品質管理に関する研究

ワクチン製造承認株、マスターシード、製造用ワーキングシード及び 5 代の継代可能株の理解について WHO 生物製剤基準におけるシードロットシステムの考え方と我国のワクチン原液製造の実態を比較して、麻しん、おたふくかぜ及び風しん各ワクチン製造へのシステム導入の要件を考察した。臨床試験で安全性と有効性が確認されたワクチンを製造承認株として、同質のワクチンを連続的かつ恒常的に製造するためには、マスターシードロット及びワーキングシードロットの定義を定めること、均一な構成で充分性質の良く調べられたシードロットが

大量に用意されること、シードロットやワクチン製造に製造承認株を作製した時の培養条件を再現することの重要性について共通理解することがまず第一に必要と考えられた。[海野幸子、大槻紀之]

### 麻疹ウイルスに関する研究

#### 1. Vero/hSLAM 細胞の有用性に関する研究

臨床検体からの麻疹ウイルス分離効率を Vero/hSLAM 細胞と B95a 細胞で比較し、両者に差がないことを確認した。また同一検体から両細胞で得られた麻疹ウイルスの H 及び N 遺伝子の塩基配列は完全に一致していた。さらに Vero/hSLAM 細胞を用いると、風疹ウイルスの増殖効率が RK13 より良くなることも明らかにした。Vero/hSLAM 細胞は麻疹だけでなく風疹のサーベイランスにも有用な細胞といえる。[齋藤義弘、海野幸子、田代真人]

#### 2. てんかん、重症心身障害児・者への予防接種基準重症児（者）における麻疹ワクチン接種の有効性と安全性の検討

重度心身障害者への麻疹ワクチンの接種における安全性と有効性を検証するために、接種前後での麻疹免疫の上昇、各種サイトカインや血球数の変動を調べた。麻疹抗体の上昇から有効性が認められ、特別な副反応も認められなかった。[岡田晴恵、秋元未来、田代真人]

#### 3. 牛血清を使用しない麻しんワクチン製造法の開発に関する研究

現行の弱毒生麻しんワクチンの製造には鶏初代胚細胞が利用され、その製造過程において牛やその他の動物由来成分が使用されている。ワクチンの安全性を確保するために初代鶏胚細胞の作製からウイルスの増殖まで動物由来成分を全く使用しないで麻しんワクチンの製造が可能かどうか検討を行った。現在使用可能な無血清培地や酵素を用いて麻疹ワクチンウイルスを増やした場合、増殖量は従来法の約 1/10 であった。現行の製造法と同量量のワクチンウイルスを得るためには、さらなる技術的な検討が必要である。[齋藤義弘、大槻紀之、沼崎啓、田代真人]

#### 4. 麻しんワクチンのシードロットシステム導入における問題点に関する研究

麻しんワクチンの製造においてもシードロットシステムの導入は不可欠である。わが国の生物学的製剤基準のもとで、本システムを導入するには、各メーカーがその実情に合わせて十分な量のワーキングシードを設定し、そのシードウイルスの性状が弱毒確認試験に合格したウイルスと同等であることをサル以外の試験法で証明しておく必要があると考えられた。[齋藤義弘、沼崎啓、田代真人]

### IV. ムンプスウイルスに関する研究

#### 1. おたふくかぜ生ワクチン接種後のムンプス発症例

おたふくかぜ生ワクチン接種後にムンプスを発症した 4 例について調査をおこなった。1 例目はワクチン接種後、1 年 9 ヶ月目に耳下腺腫脹を訴えたケースであり、IgM の大幅な上昇と野外株が分離されことから、ワクチンがテイクしていなかったと判断した。2 例目、3 例目はどちらも接種後 2~3 週で耳下腺腫脹が現れたケースであり、どちらからもムンプスワクチン株ウイルスが分離され、ワクチンの副反応と判断した。4 例目は、接種後 40 日目に風邪様症状の無いまま発熱し、徐々に活気が低下し、傾眠傾向を示したケースである。髄液からムンプスワクチン株ウイルスが分離された。ワクチンの副反応による非典型的な無菌性髄膜炎と判断した。[加藤篤、久保田 耐、名木田 章\*、田辺 良\*\*、田代真人 :\* 水島中央病院、\*\*船橋市立医療センター]

#### 2. おたふくかぜ生ワクチンの牛由来成分を使用しない培養方法に関する研究

現行のおたふくかぜ生ワクチンは牛血清等の動物由来物質を含む培地で増殖維持されたニワトリ胚繊維芽細胞 (CEF) を用いて製造される。ワクチン製造における動物由来因子の使用はそれらに由来する感染性因子が製剤中に迷入する危険性を伴う。そこで、従来の牛血清入り培地と、無血清培地とでそれぞれ培養した CEF 細胞に市販ワクチン等を接種し、8 代まで継代した。増殖して行くウイルスの性状をブラックサイズの変化によって検討したところ、無血清合成培地で培養した CEF に 8 代継代したウイルスのブラックサイズの平均値は有意に低下

していた。これは、継代によりウイルスが変わってしまう可能性を示しており、無血清培地の使用を製造現場に当てはめるのは、慎重に行った方がよいと思われた。

[加藤 篤、木所 稔、久保田 耐、田代真人]

### 3. おたふくかぜ生ワクチン製造株の品質管理に関する研究

我国の生物製剤の品質管理方法においてシードロットシステムが議論され、それを生ワクチンの製造に採用し、均一な製品にすべきであると言われて久しい。しかし、生ワクチンをシードロットシステムへ切替える作業は進んでおらず、未だこの方式の統一的な採用にはなっていない。進行を阻んでいる原因は、主に製造用保存株と製造用ワーキング株という概念が定着していないことであることが明らかになった。[加藤 篤、木所 稔、久保田 耐、田代真人]

### 4. ムンプスウイルスの IFN 作用抑制機構の研究

ムンプスウイルス感染細胞ではインターフェロン (IFN) による抗ウイルス効果が抑制されており、その原因はウイルス V 蛋白質により宿主 IFN 情報伝達系に関わる STAT1 蛋白質が分解されるためだとされている。一方、麻疹ウイルスでもウイルス V 蛋白質により IFN による抗ウイルス効果が抑制される事が見いだされたが、この場合は STAT1 蛋白質の分解はない。ムンプスウイルスの IFN 情報伝達系阻害に STAT1 分解が必須であるかどうかを改めて詳細に検討した。その結果、ムンプスウイルス感染に伴い、STAT1 が完全に消失していないにもかかわらず、抗ウイルス効果の発動が阻止される例がみられた。このような例においては IFN により誘導される STAT1 のリン酸化および核移行が抑制されていた。これらのことからムンプスウイルスには STAT1 分解消失以外の IFN 情報伝達系阻害機構が存在すると考えられた。[久保田 耐、加藤 篤、横沢紀子\*、横田伸一\*、藤井暢弘\* : \*札幌医大]

## V. インターフェロン・サイトカイン・重症急性呼吸器症候群(SARS)に関する研究

### 1. SARS-CoV S 蛋白質のプロテアーゼによる解裂と膜融合活性

SARS-CoV は、粒子表面の S 蛋白質が受容体に結合し、エンドソーム内に取り込まれ、エンドソーム経路で細胞内へ侵入する。最近、S 蛋白質がトリプシンにより解裂すると膜融合が惹起されることが報告され、エンドソーム内での S 蛋白質の解裂及び膜融合活性の活性化が示唆されている。この新しいメカニズムを解析するために、SARS-CoV 感染細胞を用いて、トリプシン等のプロテアーゼの融合能活性化を調べた。SARS-CoV 感染細胞を trypsin、thermolysin、dispase で処理すると、強い細胞融合が認められ、100kD に解裂した S2 サブユニットが認められた。Collagenase 等の処理では細胞融合は弱く、S2 は認められなかった。プロテアーゼ処理後に残存する 100kD の S2 の存在と膜融合活性の発現が一致することから、S 蛋白質の活性化には、S 蛋白質の解裂による S2 の出現が必要であると推測された。[松山州徳、川瀬みゆき、石井孝司\*、森川茂\*\*、田代真人、田口文広 : \*ウイルス第 2 部、\*\*ウイルス第 1 部]

### 2. SARS-CoV スパイク (S) 蛋白質の細胞融合活性に関する研究：解裂 S 蛋白質による解析

SARS-CoV S 蛋白質は受容体に結合後、エンドソームに輸送され、その酸性環境下で活性化される蛋白分解酵素により S 蛋白質の解裂が起り、その結果エンペローブとエンドソーム膜が融合し、ウイルスゲノムが細胞内に放出されるという細胞侵入機構が提唱されている。我々は、SARS-CoV による膜融合に S 蛋白質の解裂がどのように関与しているのかを知る目的で SARS-CoV S 蛋白質に解裂シグナルを導入した変異 S 蛋白質を作製し、その細胞融合能について検討した。SARS-CoV S 蛋白質中程には 2 か所の塩基性アミノ酸クラスター [アミノ酸 758-761(1)、793-797(2)] が存在する。各々の部位を MHVS 蛋白質の宿主プロテアーゼ依存性の解裂シグナルと類似のアミノ酸配列に置換した変異 SARS-S 遺伝子を作製し VeroE6 細胞で発現させた。解裂シグナルを持たない親株 S 蛋白質は細胞融合活性を示さなかったが、解裂部位導入 S 発現細胞では細胞融合が認められた。これらの結果から、SARS-CoV S 蛋白質は特異的な解裂により細胞融合活性を獲得することが推測された。[前島雅美、福士秀悦\*、松山州徳、中垣慶子、森川茂\*、田代真人、田口文広 : \*ウイルス第 1 部]

3. マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究：spinoculation 法を用いた解析

マウス肝炎ウイルス(MHV)は特異的受容体(MHVR)を介して細胞に侵入する。MHV-cl-2株はMHVRを介し感染後、感染細胞からMHVRを発現しない細胞へ感染する(MHVR非依存性感染)が、その変異株srr7はこの活性がない。MHVR非依存性感染は、S蛋白がMHVRに結合すること無く膜融合能が活性化されるためと考えられる。このことは、ウイルス粒子が細胞表面に接することにより、MHVR非発現細胞へも感染が成立する可能性を示唆している。そこで、spinoculation法でウイルス粒子を細胞に隣接させることにより、MHVRを持たない細胞へ感染するか否かを検討した。MHVR非発現BHK細胞にcl-2とsrr7を $10^5$  PFU接種し、3000 rpmで2時間遠心すると、cl-2株では約500個のsyncytiumが観察されたが、srr7接種細胞ではsyncytium形成は全く認められなかった。このことから、cl-2は遠心によって細胞に接触後、S蛋白の活性化が起こり細胞内侵入するが、srr7にはその活性がないことが検証された。[鈴木一充、松山州徳、中垣慶子、田口文広]

4. マウス肝炎ウイルス(MHV)の神経系細胞における第一標的細胞と感染様式

マウス肝炎ウイルス(MHV)JHM-cl-2株は神経親和性を示し、脳内ではMHV受容体(MHVR)発現のない多種類の細胞に感染することから、感染拡大はMHVR非依存性である可能性が示唆されてきた。株化培養細胞系ではcl-2はMHVR発現細胞に感染し、その後受容体非発現細胞にも感染が拡大するが、その変異株srr7はその活性を欠くことが知られている。本実験では神経系培養細胞を用いてMHVR非依存性感染を解析した。MHVRに対する抗体CC1を用いたFACSで解析から、MHVRはmicrogliaに発現していた。神経系細胞混合培養系での感染では、cl-2感染は8時間頃から検出され、時間と共に拡大したが、srr7はごく少数の細胞に感染し、拡大は観察されなかった。cl-2の初感染はCC1で阻止されたが、感染拡大は阻止されなかった。これらの結果から、cl-2は神経系混合培養細胞においても、最初受容体を持つmicrogliaに感染し、その後受容体非発現の多くの神

経系細胞へと感染拡大することが示唆された。[中垣慶子、中垣和英\*、田口文広：\*日本獣医畜産大学]

5. 急性ウイルス性呼吸器疾患原因ウイルスのレファレンス体制構築に関する対応

急性ウイルス性呼吸器疾患原因ウイルスのレファレンス体制を再整備することを目的として、ヒトRespiratory syncytial(RS)ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ヒトライノウイルス及びヒトアデノウイルス(一部の血清型)について標準株および/あるいは臨床分離株の収集、保存を行った。また、これらウイルスの増殖に適な細胞培養系の保存、血清学的同定に用いる標準抗血清の保存等、リファレンスに必要な試料の確保をあわせて行った。[野田雅博、荻野利夫、田代真人]

6. 抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体力価測定に関する基礎的検討

新生児、乳児および小児におけるRSウイルス感染による重篤な下気道疾患の発症抑制に使用される抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体の含有力価(中和価)測定するための基礎的検討を行った。その結果、中和反応条件は36, 60分間、感染標的細胞はHEp-2C細胞あるいはNIH H-292細胞で良好な成績が得られた。所定の容量に溶解された製剤の標準RSウイルス株(サブクラスA:Long株およびサブクラスB:Wash 18537株)に対する中和価は、 $100 \times 2^{9-10}$ 倍を示した。対照に用いる標準血清の選択、測定価の標準化等について継続検討中である。[野田雅博、田代真人]

7. 国内臨床分離株の抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体に対する反応性

臨床分離株において抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体に対して難結合性の株の存在の有無を検討した。国内臨床分離株30株(サブクラスA:15株、サブクラスB:10株およびサブクラス未同定株:5株)を用いて中和反応を行った結果、今回供試した30株はすべてに抗RSウイルスヒト化モノクローナル抗体で中和された。同様の検討は継続する予定である。

[野田雅博、田代真人、水田克己\*、七種美和子\*\*、野口

有三\*\*，近藤玲子\*\*\*，大瀬戸光明\*\*\*：\*山形県衛生研究所，\*\*横浜市衛生研究所，愛媛県立衛生環境研究所\*\*\*]

#### 8. RS ウイルス感染症診断マニュアルの作成

RS ウイルス感染症は感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の改正に伴い，新たに 4 類感染症に位置づけられた。そこで RS ウイルス感染症診断マニュアルを新たに作成し，感染症研究所から各地方衛生研究所へ配布されている病原体検査マニュアルの改訂版に追加掲載した。

[野田雅博，田代真人，一戸真人\*，吉住正和\*\*，木村博一\*\*，七種美和子\*\*\*，野口有三\*\*\*，加瀬哲男\*\*\*\*：\*千葉県衛生研究所，\*\*群馬県衛生環境研究所，\*\*\*横浜市衛生研究所，\*\*\*\*大阪府公衆衛生研究所]

#### 9. 感染症流行予測調査事業に係る感染源調査

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 15 条の規定に基づき，計 386 例の検体からウイルス分離を実施した。[野田雅博，宮嶋直子，荻野利夫，今井正樹，二宮愛，小田切孝人，田代真人]

#### 10. センダイウイルス(SeV) C 蛋白発現細胞での IFN 作用抑制機構の研究

センダイウイルス(SeV)C 蛋白発現 HeLa 細胞は 3 種のインターフェロン (IFN) のいずれに対しても完全な抵抗性を示す。昨年引き続き IFN に対する抵抗性のメカニズムについて検討した。SeVC 蛋白発現 HeLa 細胞では IFN $\alpha$  処理後リン酸化された STAT1 が巨大分子を形成して蓄積し，正常な脱リン酸化反応が起きない機構が働いている可能性が考えられた。STAT1 が形成する複合体について，脱リン酸化に関係すると思われる分子を免疫沈降で解明することを試みたが，明確な関与分子を決定するにはいたらなかった。[斉藤早久良，加藤篤]

#### 11. パラミクソウイルスのアクセサリー遺伝子の機能

パラミクソウイルスのアクセサリー遺伝子である V や C 蛋白質の機能について，最近，センダイウイルス(SeV) の C 蛋白質，ムンプスウイルス，ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型，ニューカッスル病ウイルス，麻疹ウイ

ルスの V 蛋白質がインターフェロン(IFN)のシグナル伝達を阻害し，細胞が抗ウイルス状態になるのを妨げていることが明らかになってきた。そこで，SeV の C 蛋白質のどの部分が抗 IFN 効果にとって重要かを調べるために荷電アミノ酸をアラニンに置換した変異 C 蛋白質を複製し，その抗 IFN 能を調べたところ，151/153/154 のアミノ酸が関わっており，また STAT1 と C 蛋白質の結合と抗 IFN の発揮との間の相関が無いことが判明した。[加藤 篤，久保田 耐，田代真人，永井美之\*：\*富山衛研]

## VI. その他の研究

### 1. 痘瘡ワクチン株の改良と B5R 遺伝子の機能解析

我々は，高度弱毒痘瘡ワクチン株 LC16m8 は復帰変異を起こしやすく，その原因遺伝子が B5R 遺伝子であることを突きとめた。そこで，復帰変異の起こりにくい改良型ワクチン株を開発するために，LC16m8 株から B5R 遺伝子を完全に取り除いた m8 を作出した。m8 は，LC16m8 に比べて遺伝的安定性に優れ，動物に対する病原性は同程度に低く，一方で米国の現行ワクチン Dryvax に遜色のない強い感染防御免疫を誘導することが証明された。これらの結果から，m8 は安全で有効な痘瘡ワクチンおよびウイルスベクターとなりうることを示された。また BALB/c マウスの感染防御実験において m8 の感染防御免疫誘導能が，野生型 B5R を発現するウイルス (m8B5R 株) より有意に高かったことから，我々は，従来ボックスウイルスの感染防御に不可欠であると考えられていた B5R 遺伝子が必ずしも感染防御に必須ではないことを証明した。[木所 稔，田代真人，志田壽利\*：\*北海道大学遺伝子病制御研究所]

### 2. ワクチン開発迅速化のためのセンダイウイルスベクター基盤的技術開発の研究

センダイウイルスは，ほ乳類細胞や鳥類細胞で旺盛に増殖するため，センダイウイルスをベクターとした場合にも，多くの細胞で大量発現を期待できる。新型インフルエンザウイルスの世界的規模での流行に備えるためにはワクチンによる予防がもっとも効果的とされている。しかし，ヒトへの病原性を持った株を，現状の製造工程を使ってそのままワクチンとすることは困難が予想される。そこで，H5 型インフルエンザウイルスの HA を組



込みこんだセンダイウイルスで HA 蛋白質を発現させた。発現 H5 蛋白質は、培地にトリプシンを加えなくも感染細胞で HA1 と HA2 に開裂していた。[加藤 篤、森本金次郎\* : \*ウイルス第一部]

## レファレンス業務

### 1. インフルエンザ HA ワクチンの国家検定のための標準抗原・参照抗血清の作製

平成 16 年度のインフルエンザ HA ワクチンに使用するワクチン株である

A/NewCaledonia/20/99(IVR-116)(H1N1) 、

A/Wyoming/3/2003(IVR-134) (H3N2)、

B/Shanghai/361/2002 の 3 株について国家検定の力価試験に使用する参照抗インフルエンザ HA 抗血清と標準インフルエンザ HA 抗原（一元放射拡散試験用）を作製した。標準インフルエンザ HA 抗原に含有される HA 抗原の含有量の設定を、英国、米国の生物製剤に関する国立試験研究機関である NIBSC、CBER と協力して国際的な標準に基づいて実施した。また、海外の標準抗原の抗原量の設定についても同様に協力を行った。

[板村繁之、金子睦子、小田切孝人、田代真人]

### 2. 高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアルの作成

2003 年末から始まった東アジア諸国における高病原性 A/H5N1 鳥インフルエンザの被害は家禽だけでなく、鳥からの直接感染による死者はこれまでに 50 名を超えている。我が国でも、2004 年初頭にニワトリへの感染があったことから、今後、各地方衛生研究所において高病原性鳥インフルエンザの診断を行う必要性が生じた場合に備え、診断マニュアルを整備しておく必要がある。感染研から各地衛研に配布される病原体検査マニュアルの改正に伴い、従来の方法に比べ、より感度の高い高病原性鳥インフルエンザウイルスの遺伝子診断法を開発し、ウイルス分離法と合わせてマニュアルに掲載した。[今井正樹、二宮愛、小淵正次、板村繁之、西藤岳彦、斉藤利憲、小田切孝人、田代真人]

### 3. 動物インフルエンザウイルス系統保存における共同研究

新型インフルエンザウイルスの出現時に、それに抗原

性が近似したワクチン製造株を速やかに供給できるように、自然界に存在する A 型の 15 種類全ての HA 亜型のウイルスの収集・系統的分類およびそれらに対する抗血清の作製を完了させた。本年度は新たに野鳥とブタからそれぞれ 6 株と 4 株のインフルエンザウイルスが分離された。それらの抗原解析を行った結果、トリウイルスの 6 株は A/H7N7 型であること、ブタウイルスの 4 株は A/H1N2 型であることが判明し、これら分離株は感染研の動物インフルエンザウイルス保存バンクに組み込まれた。また、ウイルスを分離し供与してくれた地衛研には、それらの解析結果を個別に還元した。[今井正樹、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、小淵正次、斉藤利憲、小田切孝人、田代真人]

## サーベイランス業務

### 1. インフルエンザウイルス流行株のサーベイランス

インフルエンザの流行状況を把握し、次シーズンのワクチン株を選定するために全国 74 地方衛生研究所および関連施設の協力のもとに、インフルエンザウイルス流行株の詳細な性状解析をおこなった。2004/2005 シーズンは昨シーズンより流行の立ち上がりが遅く、第 6~7 週目にピークが見られ、いくつかの県では A/H3 の散発的な流行が 4 月以降も見られた。A/H1、A/H3、B 型の分離比はそれぞれ 3%、41%、56%であった。A/H1 の流行は小さいながら 3 シーズンぶりに見られ、その大半はワクチン株 A/New Caledonia/20/99 類似株であった。A/H3 はシーズン前半ではワクチン株 A/Wyoming/3/2003 と抗原的に区別できなかったが、シーズン後半には A/Wyoming/3/2003 とは抗原性の異なる株が増える傾向が見られた。HA 遺伝子解析から、分離株のほとんどは A/California/7/2004 に特徴的なアミノ酸置換 K145N を持ち、A/Wyoming/3/2003 とは遺伝的に区別できる一群を形成した。B 型は山形系統が分離株の 99%以上を占め、ワクチン株 B/上海/361/2002 類似株が大半であった。一方、少数分離された Victoria 系統株は代表株 B/Brisbane/32/2002 や B/山東/7/97 からは抗原的に変化していた。これら、解析結果は定期的に WISH を通じて地方衛生研究所に報告された。また、年 2 回開催される WHO インフルエンザワクチン株選定会議で報告された。さらに衛生微生物技術協議会、ウイルス学会

等の研究集会を通じて研究機関へ還元され、感染研 HP で一般にも還元された。[西藤岳彦、小淵正次、斎藤利憲、松澤哲宏、安西和子、福家優、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子、小田切孝人、田代真人]

## 2. ノイラミニダーゼ阻害剤耐性株サーベイランス

我が国では世界で使用されている抗インフルエンザ薬（ノイラミニダーゼ阻害剤）の 2/3 が消費されており、国内の研究グループからは我が国の小児で薬剤耐性株が高頻度に見いだされたという報告がなされた。そこで、WHO ノイラミニダーゼ阻害剤耐性株ネットワーク（NISN）の一員として我が国におけるノイラミニダーゼ阻害剤耐性株のサーベイランスを実施した。全国の地方衛生研究所の協力を得て 2003/2004 シーズンの分離株約 1300 株を収集し、海外検査機関に送付しスクリーニングを行った。解析した約 1200 株において 4 株のオセルタミビル耐性株が見いだされ、それらの NA 遺伝子の全塩基配列を決定した。[西藤岳彦、小淵正次、斎藤利憲、松澤哲宏、安西和子、福家優、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子、小田切孝人、田代真人]

## 3. ブタへの新型インフルエンザウイルスの侵入監視における研究

鳥インフルエンザウイルスが中間宿主のブタの世界に侵入しているのか否かを監視するために、全国 29 地区の地衛研に依頼して、ブタでの A 型 H1、A 型 H5、A 型 H7、A 型 H9 ウイルスに対する抗体調査を行った。血清中の抗体価は、A/swine/埼玉/27/2003 (H1N2)、A/Vietnam/1194/2004(NIBRG-14)(H5N1)、A/mallard/Netherlands/12/00 ( H7N3 )、A/ 香港 /2108/2003 (H9N2)各不活化ウイルスを抗原に用い赤血球凝集抑制試験にて測定した。その結果、H1 のブタインフルエンザウイルスに対する陽性例は 29 地区中 12 地区のブタで検出され、このウイルスに類似した株が国内のブタに広く浸淫していることが明らかになった。一方、H5 と H7 の鳥インフルエンザウイルスに対しては全て陰性であった。なお、H9 の鳥インフルエンザウイルスについては現在調査中である。

現行の血清診断法は、鳥インフルエンザウイルスに対する陽性反応が感染による特異反応なのか他の亜型への

交差反応なのか判定できないなどの問題点がある。そのため、血清調査から得た結果を新型インフルエンザウイルスの侵入監視対策に反映させることは難しい。そこで、来年度は現行法に代わる調査法として、培養細胞によるウイルス分離法を用い、ブタの呼吸器からインフルエンザウイルスを直接検出する予定である。 [今井正樹、二宮愛、野田雅博、宮嶋直子、荻野利夫、小田切孝人、田代真人]

## 4. 風疹の流行予測調査

風疹は感染症流行予測調査の対象疾病であるため、感受性調査用標準血清（HI 抗体陽性血清と陰性血清）を 13 県に提供し、それらの抗体調査結果を解析した。[海野幸子、大槻紀之、加藤宏幸、感染症情報センター第三室]

## 品質管理に関する業務

### 1. インフルエンザ HA ワクチンの安全性向上のための品質管理に関する研究

インフルエンザワクチンの力価試験として 2000 年に一元放射免疫拡散試験法が導入され、それとともにワクチンに含有される総蛋白量が増加し生物学的製剤基準の上限に近いワクチンも出現してきた。また、マウス白血球数減少試験においても基準の上限に近いワクチンが散見されるようになってきた。そこで、ワクチンの安全性と有効性を確保するために必要な品質管理の試験方法の改良・開発やその意義について研究を実施し、現行の基準改訂の基礎となる知見を得ることを目指した。その結果、マウス白血球数減少活性と相関する生体反応として IFN の産生を見出した。この反応はワクチン効果の基礎になる免疫応答とは別の機構として機能していることが示唆された。また、より精度、再現性の高いマウス白血球数減少試験法を確立し、品質管理を容易にすることを可能にした。さらに、ワクチンの総蛋白含量とマウス白血球数減少活性との関係について解析したところ、現行の蛋白含量の基準である 240  $\mu\text{g/ml}$  以下よりも高い 300、800  $\mu\text{g/ml}$  に設定したワクチンでも現行基準を上回る活性を検出できなかった。従って現行のワクチンの蛋白含量の基準値を上げるのにマウス白血球数減少試験の基準を変更する必要はないと考えられる。一方、現行

力価試験が必ずしも免疫原性を担保しない可能性が見出され、引き続き検討を進めている。[板村繁之、西藤岳彦、竹森利忠\*、堀内善信\*\*、細菌製剤協会、小田切孝人、田代真人：\*免疫部、\*\*細菌第二部]

## 国際協力関係業務

### 1. WHO 西太平洋地域 (WPR) 諸国におけるインフルエンザサーベイランスへの協力

中国は新型インフルエンザの出現にとって重要な地域であるとともに世界のワクチン株となる株が多く分離される国であることから、中国におけるインフルエンザサーベイランス情報および分離株は世界のインフルエンザ対策にとって重要な役割を占めている。しかし、中国国内におけるサーベイランス網の整備や海外諸国との連携はかなり立ち遅れていることから、WHO、感染研、米国 CDC が協力して 2000 年から 5 年計画で中国のサーベイランスの強化を目的とした技術支援を行ってきた。最終年となる本年度は、感染研から田代、小田切、板村が中国のサーベイランス拠点を視察し、問題点や改良点を提言するとともにこれらを次 5 年計画に盛り込んだ。一方、中国をはじめ WPR 諸国で分離され亜型同定が行われた株は定期的に感染研に送られ (中国 123 株、台湾 13 株、モンゴル 4 株) 当室にて詳細な抗原解析、遺伝子解析が行われた。これら解析結果はそれぞれの国に適宜還元されるとともに WHO インフルエンザワクチン株選定会議でワクチン推奨株選定のための資料として活用された。[小田切孝人、西藤岳彦、小淵正次、斎藤利憲、松澤哲宏、安西和子、福家優、板村繁之、今井正樹、二宮愛、金子睦子、田代真人]

### 2. 高病原性鳥型インフルエンザウイルスのヒト感染事例に関する技術協力 (ベトナム派遣)

2003 年末から始まった東アジア各地における高病原性 A/H5N1 鳥インフルエンザの流行は、2004 年前半にやや治まったかに見えたが、2004 年後半から 2005 年初頭にかけて再燃し、この期間の死者はタイ、ベトナム、カンボジアで合計 30 名を超えた。ウイルス第 3 部第 1 室は、ベトナム、ホーチミン市のパスツール研究所らに世界保健機構 (WHO) の要請を受け、昨年度に引き続き、同研究所に 2 名 (小淵、今井) の研究員を 1 月後半

の 2 週間、さらに別の 2 名 (西藤、二宮) を 2 月前半の 2 週間派遣し、合計 4 週間にわたる技術協力を行った。現地では、同研究所における臨床検体を用いた H5 診断技術 (RT-PCR 法) の再評価、ならびに診断技術確立のための支援を行った。[小淵正次、西藤岳彦、今井正樹、二宮愛]

### 3. WHO 東南アジア地域におけるインフルエンザサーベイランスワークショップへの協力

インド、ブネー市の National Institute of Virology にて 7 月 26 日から 7 月 30 日まで、インド国内のインフルエンザ担当者を対象にインフルエンザサーベイランス網の確立を目的としたトレーニングワークショップが実施された。これに伴い、WHO の要請を受けて、現地でインフルエンザの実験室診断法の講義および実習指導を行った。[小淵正次]

### 4. Vero/hSLAM 細胞の分与

麻疹ウイルス分離用細胞として、Vero/hSLAM 細胞をその求めに応じて世界各国に分与している。本年度は、タイ、フィリピン、ニュージーランド、アレーシア、中国、シンガポール、韓国の各研究機関に分与した。[齋藤義弘、菅井敏行、沼崎啓、田代真人]

## 研修業務

### 1. 高病原性鳥インフルエンザの実験室診断についての研修・研究

ベトナムより日本学術振興会のアジア諸国との学術交流事業による招へい研究者 1 名を平成 16 年 11 月 4 日から 12 月 2 日まで受け入れ、アジア地域で流行する高病原性鳥インフルエンザウイルスの実験室診断について研修・研究を行った。

### 2. インフルエンザサーベイランストレーニングワークショップの開催

2003 年から東アジア諸国において高病原性 H5N1 鳥インフルエンザが家禽で大流行し、ヒトにも感染して死者が出ていることから、新型インフルエンザウイルスの出現とそれによる世界的な汎流行が危惧されている。一方、アジア諸国の多くは通常のインフルエンザ流行に対

するサーベイランスもかなり立ち遅れており、これらの国々では新型インフルエンザ対策の一環としてヒトインフルエンザサーベイランス網の早急な整備が必要である。そこで、アジア諸国が連携をはかりサーベイランスの整備を進めるために、これらの国々を対象として 5 月 17 日から 20 日の日程でインフルエンザサーベイラントレーニングワークショップを WHO との共催で行った。バングラデシュ、インド、インドネシア、マレーシア、モンゴル、ニューカレドニア、フィリピン、タイおよびベトナムから 17 名の疫学者、ラボ研究者が参加した。また、感染研の他に米国 CDC、メルボルン WHO インフルエンザ協力センター、WHO 東南アジア地域事務局および WHO 西太平洋地域事務局から 9 名の講師陣を招へいた。ワークショップでは高病原性鳥インフルエンザの流行状況、WHO グローバルサーベイランスネットワークや我が国のサーベイランス体制、バイオセーフティの講義の他に参加国からはサーベイランスの現状が紹介され、そのあり方や問題点などについて活発な討論がなされた。さらに疫学とラボトレーニングのセッションに分かれて、それぞれ疫学調査、ウイルス学的診断等について講義、実習が行われた。[田代真人、小田切孝人、板村繁之、西藤岳彦、小淵正次、今井正樹、二宮愛、斎藤利憲、金子睦子、松澤哲宏、安西和子]

### 3. 特別課程ウイルスコース

平成 16 年 9 月 14 日～10 月 15 日、インフルエンザサーベイランスの実習、麻疹・風疹・RS ウイルス感染症の各講義、実験室診断法の実習

## 発表業績一覧

### 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Imai M., Watanabe S., Ninomiya A., Obuchi M., Odagiri T. : Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virion during virus assembly. *J Virol.* 78: 11007-11015 (2004)
- 2) Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, Kida H, Takada Y, Miyazaki N, Boltunov AN, Maruyama T. : Antibodies to human-related H3 influenza A virus in Baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia.

- Microbiol. Immunol.* 48:905-909 (2004)
- 3) Saito T, Nakaya Y, Suzuki T, Ito R, Saito T, Saito H, Takao S, Sahara K, Odagiri T, Murata T, Usui T, Suzuki Y, and Tashiro M. : Antigenic alteration of influenza B virus associated with loss of a glycosylation site due to host-cell adaptation. *J. Med. Virol.* 74 :336-343 (2004)
- 4) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto S, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu T, Yokota A. subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *International Immunol.* 16 :1423-1430 (2004)
- 5) Haagmans, B.L., Kuilen, T., Martina, B.E., Fouchier, R.A.M., Rimmelzwaan, G.F., van Amerongen, G., van Riel, D., de Jong, T., Itamura, S., Chan, K., Tashiro, M., Osterhaus, A.D.M.E.: Pegylated interferon- $\alpha$  protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nature Medicine* 10: 290-293 (2004)
- 6) Hien, T.T., Liem, N.T., Dung, N.T., San, L.T., Mai, P.P., Chau, N.V., Suu, P.T., Dong, V.C., Mai, L.T.Q., Thi, N.T., Khoa, D.B., Phat, L.P., Truong, N.T., Long, H.T., Giang, L.T., Tho, N.D., Kim Tien, N.T., San, L.H., Tuan, L.V., Dolecek, C., Thanh, T.T., de Jong, M., Schultsz, C., Cheng, P., Lim, W., Horby, P., the World Health Organization International Avian Influenza Investigative Team (Bhat, N., Brudon, P., Calain, P., Curns, A., Doran, R., Fukuda, F., Grein, T., Horby, P., Itamura, S., Miranda, N., Uyeki, T.), Farrar, J. : Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350: 1179-1188 (2004)
- 7) Iwasaki, T., Itamura, S., Nishimura, H., Sato, Y., Tashiro, M., Hashikawa, T., Kurata, T.: Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol.* 108 : 485-492 (2004)
- 8) Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, Ohtsuki N, Itoh O. Characterization of a 39kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol.* 20;100(1-2) :43-53 (2004)
- 9) Esaki H, Noda K, Otsuki N, Kojima A, Asai T, Tamura Y,

- Takahashi T. Rapid detection of quinolone-resistant Salmonella by real time SNP genotyping. J Microbiol Methods. 58(1) :131-4 (2004)
- 10)Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, Katayama Y, Ohtsuki N, Itoh O. Invasion of chicken embryo fibroblast cells by avian Pasteurella multocida. Vet Microbiol. 30 :104(1-2):55-62 (2004)
- 11)Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, T. Kubota, N. Otsuki, M. Kohase, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. J Virol. 76:7114-7124 (2004)
- 12)Nagai, Y. and A. Kato. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, in press. In Y. Kawaoka (ed.), Biology of Negative Strand RNA Viruses: The Power of Reverse Genetics, Springer-Verlag GmbH and Co. KG, Curr. Topic Microbiol. Immunol 283:198-248 (2004)
- 13)Saika S, Kidokoro M, Aoki, and A, Ohkawa T. Neurovirulence of mumps virus: Intraspinal inoculation test in marmosets. Biologicals, 32 :147-152 (2004)
- 14)Kidokoro, M., M. Tashiro, and H., Shida. Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 :4152-4157 (2005)
- 15)Miyajima N, Takeda M, TashiroM, Hashimoto K, Yanagi Y, Nagata K, and Takeuchi, K. Cell tropism of wild-type measles virus is affected by amino acid substitutions in the P, V and M proteins, or by a truncation in the C protein. J Gen Virol 85 :3001-3006 (2004).
- 16)Takeda M, Ohno S, Seki F, Hashimoto K, Miyajima N, Takeuchi K, and Yanagi Y. Efficient rescue of measles virus from cloned cDNA using SLAM-expressing Chinese hamster ovary cells. Virus Res. 108 :161-165 (2005)
2. 和文発表
- 1)小田切孝人、二宮愛、板村繁之、西藤岳彦、宮嶋直子、森川茂、西條政幸、田代真人：SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果 インフルエンザ 5 :35-24 (2004)
- 2)小田切孝人：東アジア諸国で大流行している高病原性トリインフルエンザウイルス 小児科 45 :434-439 (2004)
- 3)小田切孝：SARS の検出 からだの科学 [ 増刊 ] :9-14 (2004)
- 4)板村繁之：SRAS、新型インフルエンザ、トリインフルエンザ-missing link を探して 蛋白質核酸酵素 49 : 772-780 (2004)
- 5)板村繁之：SARS に対する抗ウイルス療法の開発 医学のあゆみ 210: 160 (2004)
- 6)板村繁之：インフルエンザ・鳥インフルエンザ「ネオエスカ 感染症・アレルギーと生体防御」 同文書院 31-38 (2005)
- 7)板村繁之：インフルエンザワクチンとは、どのようなものですか「医療者のためのインフルエンザの知識」医学書院 122-125 (2005)
- 8)板村繁之：インフルエンザワクチンは、特にどのような人に接種が必要ですか「医療者のためのインフルエンザの知識」医学書院 131 (2005)
- 9)板村繁之：インフルエンザワクチンの有効性・有効期間について教えてください「医療者のためのインフルエンザの知識」医学書院 133-135 (2005)
- 10)板村繁之：抗インフルエンザ薬による予防と予防効果について教えてください「医療者のためのインフルエンザの知識」医学書院 136-137 (2005)
- 11)板村繁之：インフルエンザ予防の経済効果について教えてください「医療者のためのインフルエンザの知識」医学書院 138-139 (2005)
- 12)大槻紀之、田口邦史、高木昌美、後藤起佐子、伊藤治：鶏用生ワクチンからのトリ白血病ウイルス遺伝子の検出 動薬検年報 41:37-40 2004
- 13)岡田晴恵、田代真人：鳥インフルエンザの脅威にどう立ち向かうか 世界(4) : 48-57 (2004)
- 14)岡田晴恵、田代真人：WHO 新型インフルエンザ会議は何を警告しているか 世界(7) : 259-266 (2004)
- 15)岡田晴恵：成人麻疹と麻疹ワクチン 化学療法の領域 20(9) : 81-86 (2004)
- 16)栗原まな、中江陽一郎、小萩沢利孝、衛藤義勝、岡田晴恵、田代真人：重症心身障害児(者)における麻疹予

- 防接種の検討 日本小児科学会雑誌 108(11) : 1372-1378 (2004)
- 17)岡田晴恵 : 鳥インフルエンザの脅威-本当の怖さはこれからだ- 河出書房新社 (2004)
- 18)田代真人、岡田晴恵 : 新型インフルエンザ大流行の脅威と対策 最新医学社 59(2) : 7-14 (2004)
- 19)岡田晴恵 : 成人麻疹の増加とその背景 Medical Tribune37(7) : 48-49 (2004)
- 20)岡田晴恵 : 現在、注目すべき感染症 風しん 助産師教育 43 : 7 (2004)
- 21)岡田晴恵 : 産婦人科における風疹-先天性風疹症候群の予防のための風疹予防接種の重要性について 助産雑誌 58(6) : 521 (2004)
- 22)岡田晴恵 : ウイルスの変異-鳥インフルエンザの伝播を機に 総合臨床 53(6) : 1981-1986 (2004)
- 23)岡田晴恵 : 緊急のお知らせ! 風疹流行とその予防風疹ワクチン接種の願い 公衆衛生 68(7) : 538-539 (2004)
- 24)田代真人、岡田晴恵、中山哲夫 : ウイルス感染症との闘い~インフルエンザ・SARS・麻疹・風疹~ ヘルシスト 28(4) : 2-10 (2004)
- 25)岡田晴恵 : 風疹ワクチン接種へのお願い-健康な赤ちゃんを授かるために-労働と健康 30(4) : 27-28 (2004)
- 26)岡田晴恵 : 風疹ワクチン接種のお願い 生まれ来る子どもたちのために 保健師ジャーナル 60(8) : 788-789 (2004)
- 27)田代真人、岡田晴恵 : インフルエンザワクチン ワクチンの事典 : 141-155 (2004)
- 28)岡田晴恵 : 麻疹の現状と学校保健現場の麻疹対策 保健師ジャーナル 60(9) : 916-920 (2004)
- 29)田代真人、岡田晴恵 : パンデミック (世界的大流行) に備えはあるか Medical Tribune37(42) 感染症版 : 64-66 (2004)
- 30)岡田晴恵、宮崎千明 : 先天性風疹症候群とワクチン戦略 現代医療 36(11) : 116-122 (2004)
- 31)岡田晴恵 : 人類 VS 感染症 岩波ジュニア新書、(2004)
- 32)岡田晴恵、田代真人、濱田篤郎 : 新型ウイルスに対する危機管理を考える Medical Tribune38(2)感染症版 : 65-68 (2005)
- 33)岡田晴恵、田代真人 : 鳥インフルエンザの流行は、何が問題なのか 日本農村医学会雑誌 53(5) : 775-782 (2005)
- 34)岡田晴恵、田代真人 : WHO が推進するインフルエンザ戦略 総合臨床 54(2) : 252-260 (2005)
- 35)加藤 篤 : 自然免疫に対抗するセンダイウイルス蛋白質 ウイルス 54:179-188 (2004)
- 36)加藤 篤 : ウイルス感染とインターフェロンシステムからの回避 臨床免疫 41:611-616 (2004)
- 37)田口文広、田代真人 : SARS の脅威 ( 2 ) 病原体の究明と診断 臨床病理レビュー特集 第 129 号 4 月 86-92, (2004)
- 38)田口文広、田代真人、納富継宣 : 特別寄稿 SARS ウイルス迅速診断 特集 小児科外来における迅速診断キットの活用 日本小児科医会会報 第 27 号 4 月 : 43-46,(2004)
- 39)水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルスのワクチンからの科学 増刊 5 月 : 21-27 (2004)
- 40)水谷哲也、田口文広 : SARS ウイルス-ワクチン開発と現状 総合臨床 第 53 号 6 月 : 1968-1975 (2004)
- 41)田口文広、田代真人 : 重症急性呼吸器症候群 ( SARS ) と SARS コロナウイルス 化学と生物第 42 号 8 月 : 546-552 (2004)
- 42)水谷哲也、田口文広 : SARS コロナウイルスのワクチン開発 細胞工学 23 巻 7 月 : 759-800 (2004)
- 43)田口文広 : SARS の迅速診断キット インフルエンザ 第 5 号 10 月 : 39-45(2004)
- 44)田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン 臨床と研究 第 81 巻 12 月 : 69-74 (2004)
- 45)田口文広 : SARS コロナウイルスとワクチン開発 現代化学 第 404 号 11 月 : 45-51 (2004)
- 46)田口文広 : SARS コロナウイルス 獣医畜産新報 第 58 巻 : 129-134 (2005)
- 47)田口文広 : SARS 「ネオエスカ感染症・アレルギーと生体防御」 同文書院 3 月 : 27-31 (2005)

#### .学会発表

##### 1. 国際学会

- 1)Umino, Y., Kato, H., Otsuki, N., T-Taya, K., Tada, Y., Okabe, N., Tashiro, M.: Current situation of Rubella in Japan: Assessment of vaccination program, Fourth World Congress

on Vaccine and Immunization, Tsukuba, Japan, September 30, 2004

2)Kato, A., C. Cortese-Grogan, S. A. Moyer, F. Sugahara, T. Sakaguchi, M. Tashiro, and Y. Nagai. Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are involved in its interferon antagonism. Workshop on Replication and Cell Biology of Negative Strand RNA Viruses. Evanston, IL, USA June 12-16, 2004

3)Kidokoro, M., M. Tashiro, and H. Shida: Novel genetically stable vaccine strains constructed from vaccinia LC16m8 and mO, IVth World Congress on Vaccines and Immunology (WCVI), Tsukuba, September 30-October 3, 2004

4)Taguchi F, Matsuyama S and Nakagaki K. Receptor-independent infection of murine coronavirus: a unique mechanism of virus spread. Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji Island, Hyogo, Japan 8-August30-September2, 2004

## 2. 国内学会

1)今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小淵正次、小田切孝人：B型インフルエンザウイルスの増殖過程におけるBM2蛋白の機能、第52回日本ウイルス学会総会、横浜、2004年11月

2)今井正樹、渡辺真治、二宮愛、小淵正次、小田切孝人：B型インフルエンザウイルスの増殖過程におけるBM2蛋白の機能 第27回日本分子生物学会年会、神戸、2004年12月

3)今井正樹：鳥インフルエンザの検査室診断法 平成16年度希少感染症診断技術研修会、国立感染症研究所、2005年2月

4)小田切孝人、西藤岳彦、小淵正次、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人：2003/2004シーズンのインフルエンザ流行株の解析と次シーズンのワクチン株 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、2004年11月

5)小田切孝人、西藤岳彦、小淵正次、斉藤利憲、板村繁之、今井正樹、二宮愛、田代真人：2003/2004シーズンのインフルエンザウイルス流行株と2004/05シーズンワクチン株 平成16年度衛生微生物技術協議会、埼玉、2004年7月

6)二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人：弱毒化鳥インフルエンザウイルスH5N1を用いたアルムアジュバントワクチンのマウスにおける有効性の検討 第8回日本ワクチン学会、札幌、2004年10月

7)二宮愛、今井正樹、田代真人、小田切孝人：弱毒化H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスを用いたアルムアジュバント添加ワクチンのマウスにおける有効性の検討 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、2004年11月

8)Odagiri T. Development of new diagnostic tools for severe acute respiratory syndrome (SARS) and for highly pathogenic avian influenza. WHO consultation on a coordinated response for the fast-track development of diagnostic tools for new and re-emerging infectious diseases. Kobe, September, 2004.

9)小田切孝人、今井正樹、二宮愛、納富継宣、峰川晴美、石崎徹、田代真人：LAMP法による高病原性鳥インフルエンザウイルス感染診断系の開発 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会、横浜、2004年11月

10)Odagiri T, Imai M, Ninomiya A, Minekawa M, Notomi T, Ishizaki T, Tashiro M. Development of H5-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system as a new diagnostic tool for detection of H5N1 avian influenza viruses. Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. Kyoto December, 2004.

11)小田切孝人：高病原性鳥インフルエンザ：鳥インフルエンザの問題点と対策 平成16年度希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所、東京、2005年2月

12)板村繁之：高病原性鳥インフルエンザ 第4回日本バイオセーフティ学会総会・学術集会、横浜、2004年11月

13)江崎英剛、能田健、大槻紀之、小島明美、浅井鉄夫、高橋敏雄：リアルタイムPCR一塩基多型(SNP)タイピング法によるキノロン耐性サルモネラ遺伝子変異検出法の確立 第137回日本獣医学会学術集会、藤沢市、2004年4月

14)斎藤正明、海野幸子：抗体検査から見た2003年の風疹 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年

11月

15) 斎藤義弘、海野幸子、柳 雄介、田代真人：麻疹ウイルスの分離および中和抗体価測定における Vero/hSLAM 細胞の有用性 第 52 回日本ウイルス学会 学術集会、横浜、2004 年 11 月

16) 岡田晴恵、秋元未来、菅井敏行、田代真人、栗原まな：重症心身障害児（者）における麻疹ワクチン接種の有効性と安全性 第 45 回日本臨床ウイルス学会、大阪、2004 年 6 月

17) 秋元未来、岡田晴恵、田代真人：大学生における麻疹・風疹ワクチン接種、罹患状況の調査について 第 45 回日本臨床ウイルス学会、大阪、2004 年 6 月

18) 栗原まな、中江陽一郎、小萩沢利孝、衛藤義勝、岡田晴恵、田代真人：重症心身障害児（者）における麻疹予防接種の検討 第 46 回日本小児神経学会、東京、2004 年 7 月

19) 岡田晴恵：てんかん、重症心身障害児・者への予防接種基準 重症児（者）における麻疹ワクチン接種の有効性と安全性の検討 第 46 回日本小児神経学会、東京、2004 年 7 月

20) 斎藤義弘、海野幸子、柳雄介、田代真人：麻疹ウイルスの分離および中和抗体価測定における Vero/hSLAM 細胞の有用性 日本ウイルス学会第 52 回学術総会、横浜、2004 年 11 月

21) 菅井敏行、田代真人、横田俊：ウイルス感染 OVA 経気道感作により作成したマウス喘息モデルにおける T 細胞サブセットおよび樹状細胞の関与 日本臨床ウイルス学会学術集会、大阪、2004 年 6 月

22) 北畠正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：組換えワクシニアウイルスによる SARS ワクチンの開発 第 8 回日本ワクチン学会、札幌、2004 年 10 月

23) 加藤 篤、久保田 耐、田代真人、永井美之：センダイウイルス C 蛋白質による抗インターフェロン効果 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

24) 久保田 耐、横沢紀子、横田伸一、藤井暢弘、田代真人、加藤 篤：ムンプスウイルスによる STAT1 分解とは異なる経路を介した宿主 IFN 情報伝達障害 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

25) 村木優子、真鍋貞夫、福家 巧、石川豊数、加藤 篤、田代真人、山西弘一、高橋理明：ムンプスウイルスの神経病原性評価法としてのマーモセット接種試験の妥当性について 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

26) 坂口剛正、菅原文博、島津幸枝、加藤 篤、井上 誠、永井美之、吉田哲也：センダイウイルス C 蛋白質は宿主因子 AIP1 と相互作用してウイルス出芽を促進する 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

27) 立川(川名)愛、細谷紀彰、加藤 篤、塩田達雄、永井美之、岩本愛吉：エピトープ欠乏 b2 ミクログロブリンと TAP 阻害タンパク質を用いた HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞への効率的な抗原提示法の開発 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

28) 木所 稔、田代真人、志田壽利：遺伝的安定性に優れた高度弱毒天然痘ワクチン株の開発 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

29) 北畠正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：ワクシニアウイルス弱毒株 LC16m8 株を用いた SARS ワクチンの開発 第 52 回日本ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

30) 砺波一夫、栗原由紀子、佐藤崇裕、天野朋和、油谷浩幸、加藤 篤、栗原裕基：Identification and functional analysis of Calpain6 as a molecule down stream to endothelin-1 signaling in branchial arch formation. 第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004 年 12 月

31) 北畠正大、安井文彦、井上真吾、森田公一、鮫島由紀恵、村井 深、水野喬介、木所 稔、志田壽利、橋本真一、松島綱治、小原道法：SARS 遺伝子組換えワクシニアウイルスによるワクチン効果の検討 第 34 回日本免疫学会、札幌、2004 年 12 月

32) 中垣慶子、中垣和英、田口文広：マウス肝炎ウイルス (MHV-JHM) の大脳分離細胞を用いた受容体発現細胞および第一標的細胞の同定 第 8 回日本神経ウイルス研究会、2004 年 6 月

33) 松山州徳、石井孝司、森川茂、田代真人、田口文広：SARS-CoV S 蛋白質のプロテアーゼによる解裂と膜融合活性 第 52 回ウイルス学会総会、横浜、2004 年 11 月

34) 前島雅美、福士秀悦、松山州徳、中垣慶子、森川茂、



- 田代真人、田口文広: SARS-CoV スパイク (S) 蛋白の細胞融合活性に関する研究: 解裂 S 蛋白による解析 第 52 回ウイルス学会総会, 横浜、2004 年 11 月
- 35) 田口文広、松山州徳: マウス肝炎ウイルスの受容体非依存性感染に関する研究: spinoculation 法を用いた解析 第 52 回ウイルス学会総会, 横浜、2004 年 11 月
- 36) 中垣慶子、中垣和英、田口文広: マウス肝炎ウイルスの神経系細胞における第一標的細胞と感染様式 第 52 回ウイルス学会総会, 横浜、2004 年 11 月
- 37) 石井孝司、横田恭子、竹森利忠、長谷川秀樹、水谷哲也、森川茂、田口文広、田代真人、吉崎佐矢香、鈴木哲朗、宮村達夫: 高度弱毒化ワクシニアウイルス株 Dis の SARS 生ワクチンとしての応用 第 52 回ウイルス学会総会, 横浜、2004 年 11 月
- 38) 西條政幸、福士秀悦、荻野利夫、田口文広、水谷哲也、松山州徳、倉根一郎、田代真人、森川茂: SARS コロナウイルスの組み換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発と評価 第 52 回ウイルス学会総会, 横浜、2004 年 11 月
- 39) 竹内薫、宮嶋直子、竹田誠、永田典代、網 康至、門田伸一、ザミラ サーネオアズ、永田恭介: 麻疹ウイルス C タンパクの in vitro あるいは in vivo における機能 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004 年 11 月